Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 2, Summer 2021, p. 207-220

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، ص. ۲۲۰-۲۰۷

مقاله علمی- پژوهشی

بررسی ارزش تغذیه‌ای کاه گندم و سرشاخه نیشکر عمل‌آوری شده توسط باکتری‌های تجزیه کننده‌ی لیگنین و لیگنوسلولز جدا شده از روده لارو کرم خراط (*Zeuzera pyrina* L.)

ایوب عزیزی[1*]، جهانشیر شاکرمی[2]، فهیمه دهقانی‌خواه[3]، افروز شریفی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۲۵

چکیده

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی ارزش تغذیه‌ای کاه گندم و سرشاخه نیشکر عمل‌آوری شده توسط باکتری‌های تجزیه کننده لیگنین و لیگنوسلولز جدا شده از دستگاه گوارش لارو کرم خراط (*Zeuzera pyrina* L.) بود. بدین منظور، ابتدا بر اساس آنالیز توالی 16S rDNA، سه ایزوله باکتریایی با قابلیت تجزیه‌کنندگی لیگنین و لیگنو سلولز شامل انتروباکتر کلوا سه (*Enterobacter cloacae*)، ا ستافیلوکوکوس ا سکویری (*Staphylococcus sciuri*) و گونه بروی‌باکتریوم (*Brevibacterium* sp.) از دستگاه گوارش این کرم جداسازی شد. سپس هر کدام از دو سوبسترای کاه گندم و سرشاخه نیشکر به‌طور مجزا توسط هر کدام از ایزوله‌های مذکور یا مخلوط هر سه آن‌ها (۴ تیمار آزمایشی برای هر سوبسترا) فرآوری شدند. در هر دو سوبسترا، بیشترین میزان ناپدید شدن ماده خشک، پروتئین خام، گوارش‌پذیری ماده خشک و انرژی قابل متابولیسم در تیمار حاوی مخلوط باکتریایی روده‌ی کرم خراط و کمترین در تیمار شاهد به دست آمد. بیشترین حجم و پتانسیل تولید گاز (b) پس از عمل‌آوری سوبستراها توسط مخلوط باکتریایی روده‌ی کرم خراط در مقایسه با تیمار شاهد به دست آمد. در هر دو سوبسترا، بیشترین غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه، استات، نسبت استات به پروپیونات و غلظت آمونیاک توسط انکوبا سیون تیمار تلقیح شده با مخلوط باکتریایی در مقایسه با تیمار شاهد به د ست آمد. در کل، نتایج این پژوهش نشان داد که عمل‌آوری کاه گندم و سر شاخه نیشکر توسط باکتری‌های مجزای روده‌ی کرم خراط، به خصوص مخلوط آنها سبب بهبود ارزش غذایی پسماندهای مذکور از طریق افزایش قابلیت هضم ماده خشک و غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه جهت استفاده به‌عنوان خوراک دام شد.

واژه‌های کلیدی: ارزش تغذیه‌ای، تولید گاز، کرم خراط، لیگنوسلولز، نشخوارکنندگان

مقدمه

شرایط اقلیمی نامساعد موجب کمبود خوراک دام در بسیاری از نقاط جهان شده است. در راستای جبران کمبودهای مزبور، عمل‌آوری و استفاده‌ی بهینه از مواد لیگنو سلولزی به‌عنوان خوراک دام ضرورت دارد (۱۴ و ۱۵). سالانه حجم زیادی از مواد لیگنو سلولزی در سرا سر جهان تولید می‌گردد. بخش زیادی از این مواد شامل کاه غلات و بقایای زراعی است که به‌عنوان منابع عمده خوراک دام در بسیاری از کشورهای جهان از جمله ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما ارزش غذایی این مواد خوراکی بسیار کم است (۱ و ۲۳). مقادیر پروتئین خام، عناصر معدنی و انرژی قابل متابولیسم مواد مذکور اندک است و خوشخوراکی کمی نیز دارند. این در حالی است که پتانسیل تولید انرژی نسبتاً زیادی دارند، زیرا عمدتاً از کربوهیدرات‌های بالقوه انرژی‌زا تشکیل شده‌اند. بنابراین، کاربرد روش‌های فراوری مناسب با هدف افزایش بازده استفاده از محتوای کربوهیدراتی آن‌ها سبب افزایش ارزش غذایی آن‌ها برای نشخوارکنندگان خواهد گردید. از جمله این

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
۲- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
۳- دانشجوی دکتری گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
۴- استادیار بخش تحقیقات علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان (اهواز)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
(*- نویسنده مسئول: Email: azizi.ay@lu.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v13i2.83479

روش ها، می توان روش های فیزیکی، شـــیمیایی، فیزیکوشـــیمیایی، اکسیداسیون آبکافت و زیستی را نام برد (۷).

روش‌های فرآوری زیستی به کار رفته تاکنون برای تجزیه لیگنین نتایج متفاوتی در پی داشـته‌اند (۱). مشـخص شـده اسـت که روش فرآوری زیســـتی در مقایســـه با دیگر روش ها ارزش غذایی مواد لیگنو سلولزی را به میزان بیشتری افزایش داده، سبب آلودگی کمتری برای دام، انسـان و محیط زیسـت شـده و در نهایت قیمت تمام شـده آن‌ها ارزانتر خواهد بود (۷). در کل، سـه دسـته از موجودات شـامل قارچ‌های پوساننده، بعضی از میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و آب و برخی حشرات قادر به تجزیه بیولوژیکی لیگنین هستند (۸ و ۱۶). قارچ‌ها، تک‌یاخته‌ها و باکتری‌ها با ترشـــح آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی دیواره سلولی امکان استفاده از مواد خشبی برای نشخوارکنندگان و نیز بعضـی از گروه‌های حشـرات را فراهم می‌کنند. حشـرات چوب‌خوار با کمک آنزیم های تولیدی توســط میکروب های روده‌ای خود قادر به تجزیه‌ی مواد لیگنوســـلولزی هســـتند. میکروارگانیســـم‌های مذکور پروتئین‌ها و آنزیم‌هایی تولید می‌کنند که قادر به جدا کردن لیگنین از لیگنوسـلولز بوده و به این ترتیب سـلولز و همی‌سـلولز را برای تجزیه شـدن و ایجاد انرژی بیشـتر در دسـترس میکروب‌های شـکمبه قرار می‌دهند (۳۳). تاکنون پژوهش های اندکی در باره جداســـازی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی لیگنین و لیگنوسـلولز از روده‌ی حشـرات چوب‌خوار صـــورت گرفته که بیشـــتر مرتبط با باکتری های روده موریانه‌های مختلف بوده است. برجی و همکاران (۱۳۸۲) در مطالعه‌ای بقایای زراعی را توسط سه باکتری تجزیه کننده‌ی لیگنین، جدا شده از دســـتگاه گوارش موریانه ها، فرآوری نموده و بهبود ارزش تغذیه‌ای بقایای مذکور را گزارش کردند. اخیراً در پژوهشـی سـه باکتری تجزیه کننده‌ی لیگنوســـلولز و لیگنین شـــامل باســـیلوس لیپنیفورمیس، آکروباکتریوم اینترمدیوم و میکروباکتریوم پالادیکولا از روده موریانه‌ها جداسازی و به روش مولکولی شناسایی شدند (۷). ایزوله‌های مذکور تأثیر اندکی بر کاهش میزان لیگنین کاه گندم و سرشاخه خرما داشتند، اما سـبب بهبود قابلیت هضـم مواد مغذی مواد لیگنوسـلولزی مذکور شدند. ذکر این نکته نیز ضروری است که در عمده تحقیقات صورت گرفته در گذشـــته اثر ایزوله های باکتریایی به‌طور مجزا بر تجزیه لیگنوسـلولز و لیگنین مورد بررسـی قرار گرفته اسـت (۷ و ۸)، این در حالی اســت که تجزیه مواد لیگنوســلولزی نیازمند مجموعه کاملی از آنزیم‌های سلولولایتیک و لیگنولایتیک می‌باشد که در تحقیق حاضر اثر تجزیه‌ی لیگنوسلولز توسط مخلوطی از باکتری‌های جداسازی شده نیز مورد بررسی قرار گرفت.

در ایران، کرم خراط (*Zeuzera pyrina* L.) یکی از آفات مهم بسیاری از گیاهان است. لارو این حشره چوب‌خوار بوده و به شاخه و تنه های بیش از ۱۵۰ گونه‌ی درختی و بوته‌ای حمله می‌کند (۳). تاکنون قارچ‌های ســـفید و قهوه‌ای پوســـاننده به عنوان اصـــلی‌ترین میکروارگانیســـم‌های تجزیه کننده‌ی لیگنین معرفی شـــده‌اند و در زمینه‌ی استفاده از باکتری‌ها تحقیقات کمی صورت گرفته و آنچه که انجام شـــده نیز در مورد باکتری‌هایی بوده که از محیط (مواد در حال پوســیدگی) جدا شــده‌اند. در رابطه با باکتری‌های اســتخراج شــده از دســتگاه گوارش حشــرات و به‌ویژه کرم خراط تحقیقات بســیار ناچیز می‌باشــد. اخیراً در پژوهشـــی با بررســـی میکروفلور روده‌ای ۳۰ گونه مختلف این حشـــره، مشـــخص شـــد کـه انتروبـاکتریـاســـه (*Enterobacteriaceae*)، باسیلاسه (*Bacillaceae*) و سودوموناسه (*Pseudomonadaceae*) بیشـــترین گونـه هـا و ســـودومونـاس (*Pseudomonas*)، بـاســـیلوس (*Bacillus*)، اســـتـافیلوکوکوس (*Staphylococcus*)، انتروباکتر (*Enterobacter*) و انتروکوکوس ها (*Enterococcus*) بیشـــترین جنس ها بودند (۳۶). با توجه مطالب فوق‌الذکر، هدف از انجام پژوهش حاضـر جداسـازی و شـناسـایی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی لیگنین و لیگنوسـلولز از دسـتگاه گوارش لارو کرم خراط و بررسی اثر آن‌ها بر فراسنجه‌های تولید گاز و تخمیر برون‌تنی کاه گندم و سرشاخه نیشکر بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری حشرات

پژوهش حاضر طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ در آزمایشگاه تغذیه دام تکمیلی، آزمایشگاه حشره‌شناسی و ایستگاه دامپروری دانشگاه لرستان صـورت گرفت. تعداد مورد نیاز از لاروهای سـن سـوم کرم‌های خراط چوبخوار از سرشاخه‌های آلوده باغات گردوی شهرستان سامان واقع در ۲۲ کیلومتری شمال شرقی شهرکرد جمع‌آوری شد. لارو سن سوم این حشره خسارت‌زایی زیادی دارد و دسترسی به آن نسبت به لاروهای سـایر سـنین آسـانتر می‌باشـد، زیرا بیشـتر در بخش‌های سـطحی و سرشاخه گیاهان و درختان وجود دارد. سپس، تشخیص و شناسایی آنها توسط متخصصان حشره‌شناسی و روش‌های موجود انجام شد. در هر مرحله جداســازی باکتری، تعداد کافی از لاروهای کرم خراط به آزمایشگاه منتقل، و دستگاه گوارش آنها جداسازی شد.

جداسـازی و شـناسـایی باکتریهای تجزیه کننده لیگنین و لیگنوسلولز

به‌منظور جداســـازی باکتری ها، از مخلوط کاملاً له شـــده و هموژنیزه‌ی روده‌ی کامل لارو کرم خراط در زیر میکروســکوپ نوری اسـتفاده شـد. پس از جدا کردن روده کامل از بدن، آن‌ها توسـط یک لوپ استریل در محیط کشت محلول نمکهای پایه (Sterile Basal Media; SBM) کاملاً له و مخلوط می‌شـــدند. در تمام آزمایش‌های مربوط به جداســازی ایزوله‌ها از محلول M9 (Media 9)، SBM یا

TB (Terrific Broth) به عنوان محلول پایه که دارای املاح معدنی هستند، استفاده شد (۱۶). در این تحقیق از روش انتخاب برای جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده‌ی مواد لیگنوسلولزی استفاده شد (۸). منظور از روش انتخاب کشت محتوای روده روی محیط کشت خاصی بود که فقط باکتری‌های با قابلیت مورد نظر امکان رشد داشته باشند. مخلوط هموژنیزه‌ی روده ابتدا در آون با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت مایع SBM حاوی نمک‌های شیمیایی همراه با لیگنین کرافت به عنوان تنها منبع کربن و انرژی کشت داده شدند (۷). سپس، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط‌های کشت مایع حاوی باکتری برداشته، و بر روی محیطهای کشت جامد مشابه اما حاوی آگار گسترش داده شد. محیطهای کشت جامد تلقیح شده به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلنی‌های رشد یافته مجدداً جداسازی شد و بر روی محیط های کشت جامد استریل حاوی مواد لیگنینی و لیگنوسلولزی مورد نظر (شامل ۳ ماده لیگنوسلولزی کاه گندم، سرشاخه نیشکر و تراشه چوب و لیگنین‌های حاصل از آن‌ها) به‌عنوان منبع کربن و انرژی کشت داده شدند. ایزوله‌هایی که به خوبی رشد کردند به‌عنوان گونه‌های جداسازی شده انتخابی در نظر گرفته شدند. پس از حصول اطمینان از خلوص ایزوله‌های نهایی بر اساس چندین بار کشت متوالی آن‌ها، اقدام به استخراج ژنوم گردید (۴). از پرایمرهای عمومی ارائه شده در جدول ۱ جهت تکثیر ژنوم باکتری‌ها استفاده شد (۱۸). مواد شیمیایی مورد استفاده برای انجام PCR شامل یک مخلوط نهایی ۲۵ میکرولیتری بود که محتوای آن شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت 1X، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر رفت و برگشت هر کدام با غلظت ۱۰ پیکومول در لیتر، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی با غلظت ۰/۲ میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۳ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم تگ پلیمراز، ۲ میکرولیتر ژنوم و ۱۷/۴ میکرولیتر آب miliQ بود.

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Table 1- Primer sequences used for conducting polymerase chain reaction (PCR)

16sF	20 bases	5′ AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16sR	20 bases	5′ACGGCTACCTTGTTACGACT 3′

برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش PCR در جدول ۲ ارائه شده است (۳۷). از محصول PCR نهایی حاصل شده برای تشخیص باکتریهای نهایی بر اساس روش توالی‌یابی ژن 16S rDNA استفاده شد و نمونه‌ها به شرکت بیوتکنولوژی بایونیر کره جنوبی (Bioneer Biotechnology Company, Seoul, South Korea) ارسال شدند.

جدول ۲- برنامه دمایی تنظیم شده برای واکنش PCR

Table 2- Thermal program used for polymerase chain reaction (PCR)

تعداد سیکل Cycle number	مرحله واکنش Reaction step	زمان Time (s)	دما Temprature (ºC)
۱ سیکل 1 cycle	دناتوره شدن اولیه Initial denaturation	300	95
۴۰ سیکل 40 cycles	دناتوره شدن Denaturation	30	94
	اتصال Annealing	30	62
	گسترش Extension	120	72
۱ سیکل 1 cycle	گسترش نهایی Final extension	600	72

عمل‌آوری لیگنوسلولز کاه گندم و سرشاخه نیشکر با ایزوله‌های جدا شده

از هر سه ایزوله جداسازی شده یا مخلوط هر سه آن‌ها برای فرآوری کاه گندم و سرشاخه نیشکر در محیط کشت مایع M9 استفاده گردید. محتوای ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) و لیگنین در کاه گندم اولیه به ترتیب ۹۵/۵، ۹۰/۲، ۳/۸۷، ۷۱/۵ و ۸/۱۵ درصد و ترکیبات مذکور در سرشاخه نیشکر به ترتیب ۳۶/۸، ۹۱/۸، ۵/۱۲، ۶۸/۱ و ۱۲/۵ درصد بود. برای هر سوبسترا تعداد ۸ ارلن مایر ۱ لیتری (۴ تیمار آزمایشی شامل ۱- فرآوری با انتروباکتر کلواسه، ۲- استافیلوکوکوس اسکویری، ۳- جنس بروی‌باکتریوم و ۴- مخلوط هر سه ایزوله، هر تیمار در ۲ تکرار) در نظر گرفته شد. بدین منظور، به داخل هر ارلن مایر میزان ۵۰۰

میلی‌لیتر محیط کشت مایع M9 و ۲/۵ درصد سوبسترای لیگنوسلولزی (معادل ۱۲/۵ گرم) قرار داده شد (۷). عمل استریل کردن ارلن‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت، پس از خنک شدن، به هر ارلن میزان ۱ میلی‌لیتر محیط کشت باکتریایی تازه که از قبل به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت نوترینت براث کشت شده بود، تلقیح گردید. سپس درب ارلن‌ها (در کل ۱۶ ارلن برای هر دو سوبسترا) بسته شده و در داخل بن‌ماری شیکردار به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، محتوای هر ارلن توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید و بقایای جمع‌آوری شده در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. بقایای خشک به دست آمده برای هر تیمار آزمایشی جهت تعیین ارزش تغذیه‌ای آنها مورد بررسی قرار گرفت (۷).

تعیین ترکیب شیمیایی نمونه‌ها

ابتدا میزان ناپدید شدن ماده خشک نمونه‌های کاه گندم و سرشاخه خرما از اختلاف بین وزن اولیه و وزن پس از انکوباسیون در محیط کشت مایع توسط ایزوله‌های باکتریایی تعیین شد. سپس آن‌ها توسط آسیاب با الک ۱ میلی‌متری آسیاب شدند. محتوای پروتئین خام نمونه‌ها با روش AOAC تعیین شد (۲). میزان لیگنین خام نیز توسط روش استاندارد محاسبه شد (۲۸).

آزمون تولید گاز روی سوبستراهای عمل‌آوری شده

جهت انجام آزمون تولید گاز از دو رأس گاو بومی خشک و غیر آبستن فیستولاگذاری شده به‌عنوان دهنده مایع شکمبه استفاده شد. گاوهای مذکور ابتدا حداقل به مدت دو هفته با یک جیره غذایی حاوی ۶۸/۵ درصد علوفه و ۳۱/۵ درصد کنسانتره تغذیه شدند. سپس قبل از خوراکدهی وعده صبح، با قرار دادن دست به داخل شکمبه از طریق فیستولا محتویات شکمبه از بخش‌های مختلف شکمبه جمع‌آوری شد. جیره آزمایشی دام‌ها حاوی ۳۰ در صد کاه گندم، ۲۳/۵ در صد سیلاژ ذرت، ۱۵ درصد یونجه خشک، ۱۰ درصد بلغور ذرت، ۲۰ درصد سبوس گندم، ۰/۵ درصد اوره، ۰/۵ درصد کربنات کلسیم، ۰/۲۵ درصد مواد معدنی و ویتامینه و ۰/۲۵ درصد نمک بر حسب ماده خشک بود. جیره مذکور که بر اساس جداول احتیاجات تغذیه‌ای گاو خشک فرموله شده بود، دو بار در روز و در حد احتیاجات نگهداری به دام‌ها تغذیه شد (۲۴). محتوای پروتئین خام و انرژی قابل متابولیسم جیره آزمایشی تغذیه شده به گاوها به ترتیب ۱۱/۵ درصد و ۲/۲ مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک بود. محتویات شکمبه در یک فلاسک عایق که از قبل توسط گاز دی اکسید کربن بی‌هوازی شده بود، در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. محتویات قبل از تزریق به داخل ویال‌های آزمایشی به وسیله چهار لایه پارچه پنیر صاف گردید. آزمون تولید گاز در سه سری (Run) مجزا صورت گرفت.

آزمون تولید گاز روی هر کدام از سوبستراهای کاه گندم و سرشاخه نیشکر عمل‌آوری شده (۴ تیمار آزمایشی و ۱۰ تکرار در هر تیمار) انجام شد. برای این منظور مقدار ۲۵۰ میلی‌گرم نمونه کاملاً خشک آسیاب شده با اندازه ذرات یک میلی‌متر به داخل هر ویال شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز قرار داده شد. سپس، هر ویال که از قبل دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به ۳۹ درجه سانتی‌گراد رسیده بود، با ۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه صاف شده و ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح گردید (۲۰). سه ویال نیز به عنوان بلانک (حاوی فقط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. با تزریق گاز دی اکسید کربن به داخل هر ویال، از بی هوازی بودن آنها اطمینان حاصل شد. سپس درب ویال‌ها توسط دستگاه پرس مخصوص بسته شد و در بن‌ماری با دمای حدود ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. فشار گاز تولیدی در ویال‌ها توسط دستگاه فشارسنج در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. سپس بر اساس معادلات مربوطه مقادیر فشار به‌دست آمده تبدیل به حجم شد (۳۲). برای تعیین پارامترهای تولید گاز از رابطه ۱ استفاده گردید (۲۶):

$$P = b(1 - e^{-ct}) \qquad (1)$$

که در آن b گاز تولیدی از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)، c ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)، t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت و P حجم گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد.

به‌منظور تعیین فراسنجه‌های تخمیر شامل گوارش‌پذیری ماده خشک (IVDMD)، انرژی قابل متابولیسم، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار تولید شده، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (۳۵)، ابتدا حجم گاز تولیدی هر ویال ثبت گردید. سپس درب ویال‌ها باز گردیده و pH آن‌ها به وسیله دستگاه pH متر (مدل 744؛ شرکت Metrohm سوئیس) ثبت گردید. محتوای هر ویال با ۲۰۰۰g× به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید (Varifuge 3.2RS, Heraeus Instruments, Germany). مقدار گوارش‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک (IVDMD) از اختلاف وزن سوبسترای اولیه و وزن بقایا پس از انکوباسیون و طبق رابطه ۲ محاسبه گردید:

IVDMD (%) = (وزن سوبسترای – وزن بقایا پس از انکوباسیون
(اولیه / وزن سوبسترای اولیه × ۱۰۰ (۲)

محتوای انرژی قابل متابولیسم (ME) خوراک‌های آزمایشی بر اساس معادله زیر (رابطه ۳) تخمین زده شد (۲۱):

$$ME\ (MJ/kg\ DM) = 2.20 + 0.136\ GAS + 0.057\ CP + 0.0029\ CP^2 \qquad (3)$$

که در آن ME انرژی قابل متابولیسم؛ GAS مقدار گاز خالص

تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (۱۲) و CP مقدار پروتئین خام به صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک می‌باشد.

غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه بر اساس روش فنل- هیپوکلرایت اندازه‌گیری شد (۹). برای این منظور، نمونه های سوپرناتانت (۵ میلی‌لیتر) سریعاً با یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند.

غلظت اسیدهای چرب فرار شامل کل اسیدهای چرب فرار، استات، پروپیونات، بوتیرات، ایزوبوتیرات، والرات و ایزووالرات در محتویات انکوبه شده ویال‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Shimadzu GC-14 B, Shimadzu, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد (۱۱). نحوه آماده‌سازی نمونه‌ها به این صورت بود که هر میلی‌لیتر مایع شکمبه سانتریفیوژ شده قبل از تزریق به داخل دستگاه گروماتوگرافی، با ۰/۲۵ میلی‌لیتر از یک محلول اسیدی حاوی ۲۰ درصد اورتوفسفریک اسید و ۲۰ میلی‌مول در لیتر ۲-اتیل بوتیرات به عنوان استاندارد داخلی مخلوط شد. دمای تزریق کننده، ستون و تشخیص دهنده دستگاه کروماتوگرافی به ترتیب ۲۷۰، ۱۷۲ و ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد بود. از هلیوم به‌عنوان گاز ناقل در دستگاه استفاده شد و تشخیص دهنده آن از نوع شعله یونی بود. دمای ستون دستگاه در شروع کار برابر ۱۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بود، به طوری که در ابتدا به مدت ۲ دقیقه در این دما نگه داشته شده، سپس به مدت ۵ دقیقه دمای آن به حدود ۲۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه افزایش یافت. ستون مورد استفاده دستگاه از نوع مویینه و به طول ۳۰ متر بود (Alltech Capillary Column, ECTM 1000, length 30 meters, inside diameter 0.53 mm, film thickness 1 micron) بود. غلظت هر یک از اسیدهای چرب فرار از تقسیم سطح زیر پیک آن اسید چرب بر سطح زیر پیک مجموع اسیدهای چرب محاسبه و به صورت میلی‌مول در لیتر بیان شد.

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تولید گاز و تخمیر نمونه‌ها با استفاده از رویه مختلط و توسط نرم‌افزار آماری SAS (۳۰) با استفاده از مدل آماری زیر (رابطه ۴) صورت گرفت:

$$Y_{ijk}= \mu + T_i + R_j + e_{ijk} \qquad (۴)$$

که در این مدل Y_{ijk}، μ، T_i، R_j و e_{ijk} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر تیمار آزمایشی ‌iام، اثر دوره آزمایش ‌jام و اثر خطای آزمایشی بود. دلیل استفاده از رویه مختلط این بود که اثر ران در مدل به‌عنوان یک اثر تصادفی در نظر گرفته شد. مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

تعیین توالی 16S rDNA نشان داد که ایزوله‌های نهایی تجزیه کننده ی لیگنین و لیگنوسلولز شامل انتروباکتر کلواسه (*Enterobacter cloacae*)، استافیلوکوکوس اسکویری (*Staphylococcus sciuri*) و گونه بروی باکتریوم (*Brevibacterium* sp.) بودند. نتایج مربوط به تغییر ترکیب شیمیایی و فراسنجه‌های تولید گاز، هضم و تخمیر نمونه‌های کاه گندم و سرشاخه نیشکر عمل‌آوری شده با باکتری‌های روده کرم خراط در جدول ۳ نشان داده شده است.

در هر دو سوبسترا، حداکثر میزان ناپدید شدن ماده خشک در تیمار فرآوری شده با مخلوط باکتریایی روده کرم خراط (مخلوطی از هر سه ایزوله) و کمترین میزان توسط تیمار شاهد مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در ارتباط با پروتئین خام، در کاه گندم فروری شده با مخلوط باکتریایی بیشترین میزان به دست آمد و کمترین میزان را تیمار شاهد به خود اختصاص داد ($P<۰/۰۵$). در دیگر سوبسترا یعنی سرشاخه نیشکر، بیشترین میزان پروتئین خام در تیمار انکوبه شده با مخلوط باکتریایی به دست آمد ($P<۰/۰۵$)، هرچند آن اختلاف معنی‌داری با فرآوری با دیگر ایزوله‌های مجزا یعنی انتروباکتر کلواسه، استافیلوکوکوس اسکویری و گونه بروی‌باکتریوم نداشت. در کاه گندم، بیشترین و کمترین میزان لیگنین به ترتیب در تیمار شاهد و تیمار انکوبه شده با مخلوط باکتریایی مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). هرچند در سرشاخه نیشکر اختلافی بین تیمارهای آزمایشی از نظر لیگنین وجود نداشت. فرآوری کاه گندم با مخلوط باکتریایی روده کرم خراط سبب افزایش معنی‌دار قابلیت هضم ماده خشک و انرژی قابل متابولیسم نمونه‌ها در مقایسه با تیمار شاهد شد ($P<۰/۰۵$). هرچند، در سرشاخه نیشکر مخلوط باکتریایی کرم خراط قابلیت هضم ماده خشک را افزایش داد ($P<۰/۰۵$)، اما اختلافی از نظر میزان انرژی قابل متابولیسم بین تیمارها وجود نداشت. در هر دو سوبسترا، بیشترین میزان پتانسیل تولید گاز (ضریب b) در تیمار فرآوری شده با مخلوط باکتریایی به دست آمد ($P<۰/۰۵$)، هرچند آن اختلافی با تیمارهای تلقیح شده با ایزوله‌های مجزا نداشت. نرخ تولید گاز (ضریب c) در هر دو سوبسترا تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت.

نمودار ۱ نتایج مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر تولید گاز تجمعی کاه گندم را نشان می‌دهد. عمل‌آوری بیولوژیکی کاه گندم تأثیری بر تولید گاز در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون نداشت. هرچند که فرآوری کاه گندم با باکتری‌های مجزا یا مخلوط هر سه آن‌ها سبب افزایش حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ (کل گاز تولیدی) ساعت پس از انکوباسیون در مقایسه با تیمار شاهد شد ($P<۰/۰۵$)، اما بیشترین میزان این پارامترها حین عمل‌آوری کاه با تیمار حاوی مخلوط باکتریایی به دست آمد که تفاوتی با تیمار تلقیح

شده با ایزوله استافیلوکوکوس اسکویری نداشت.

جدول ۳- تغییر ترکیب شیمیایی و هضم (درصد ماده خشک) و فراسنجه‌های تولید گاز (میلی‌لیتر) آزمایشگاهی کاه گندم و سرشاخه نیشکر عمل‌آوری شده با باکتری‌های روده‌ی کرم خراط[1]

Table 3- Changing chemical composition and digestion (DM basis) and *in vitro* gas production (IVGP; ml) parameters of wheat straw (WS) treated with *Zeuzera pyrina* L. gut bacteria[1]

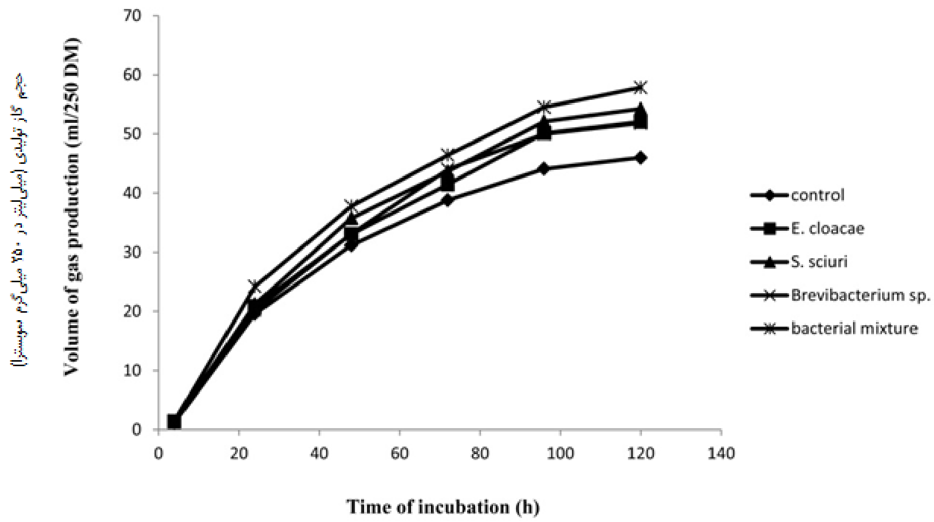
تیمارها Treatments	کاهش وزن Weight loss	پروتئین خام CP	لیگنین Lignin	ناپدید شدن ماده خشک IVDMD	انرژی قابل متابولیسم ME (MJ/kg DM)	پتانسیل تولید گاز b	نرخ تولید گاز c
کاه گندم WS							
کاه گندم (کنترل) WS (control)	2.47^{b}	3.73^{b}	8.12^{a}	34.5^{b}	5.93^{b}	46.3^{b}	0.038
کاه گندم+ انتروباکتر کلواسه WS + *E. cloacae*	4.47^{b}	4.44^{b}	7.96^{ab}	36.4^{ab}	6.06^{ab}	52.6^{ab}	0.041
کاه گندم+ استافیلوکوکوس اسکویری WS + *S. sciuri*	4.81^{b}	4.68^{b}	7.56^{bc}	37.3^{ab}	6.10^{ab}	54.9^{a}	0.044
کاه گندم+بروی‌باکتریوم WS + *Brevibacterium* sp.	4.08^{b}	4.55^{b}	7.92^{ab}	35.1^{b}	6.05^{ab}	52.2^{ab}	0.041
کاه گندم+ مخلوط باکتریایی WS + bacterial mixture	8.20^{a}	5.90^{a}	7.40^{c}	39.5^{a}	6.22^{a}	58.4^{a}	0.048
خطای استاندارد میانگین SEM	0.739	0.534	0.152	0.971	0.058	2.03	0.002
احتمال معنی‌داری P-value	<0.01	0.03	0.04	0.03	0.05	0.02	0.11
سرشاخه نیشکر ST							
سرشاخه نیشکر (کنترل) ST (control)	1.78^{d}	5.03^{b}	12.4	31.3^{b}	5.64	42.1^{b}	0.036
سرشاخه+ انتروباکتر کلواسه ST + *E. cloacae*	4.56^{b}	6.29^{ab}	11.9	33.4^{ab}	5.76	50.4^{a}	0.039
سرشاخه+ استافیلوکوکوس اسکویری ST + *S. sciuri*	4.78^{b}	6.55^{a}	11.7	34.3^{ab}	5.84	50.8^{a}	0.042
سرشاخه+بروی‌باکتریوم ST + *Brevibacterium* sp.	3.14^{c}	6.04^{ab}	11.8	32.1^{b}	5.84	49.5^{a}	0.040
سرشاخه+ مخلوط باکتریایی ST + bacterial mixture	6.29^{a}	7.29^{a}	11.8	36.2^{a}	6.05	53.8^{a}	0.044
خطای استاندارد میانگین SEM	0.277	0.432	0.277	0.912	0.098	1.28	0.004
احتمال معنی‌داری P-value	<0.01	0.04	0.09	0.02	0.10	<0.01	0.34

[1] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

[1] Means in a column with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

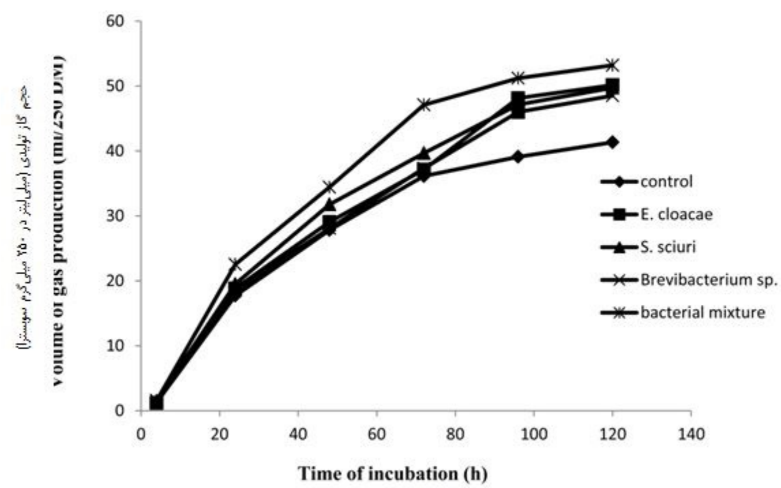
بر اساس نتایج نمودار ۲، در زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۷۲ ساعته سرشاخه نیشکر، بیشترین میزان تولید گاز در تیمار فرآوری شده با مخلوط باکتریایی به دست آمد که با سایر تیمارهای بیولوژیکی دیگر و نیز تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان تولید گاز در زمان ۴۸ ساعت و نیز کل گاز تولیدی در تیمار حاوی مخلوط باکتریایی نسبت به سایر تیمارها به دست آمد (P<۰/۰۵)، هر چند که آن با تیمار فرآوری شده با استافیلوکوکوس اسکویری تفاوتی نداشت. حداکثر میزان تولید گاز در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون در تیمار تلقیح شده با مخلوط باکتریایی در مقایسه با تیمار شاهد حاصل شد (P<۰/۰۵)، هرچند آن با تیمارهای فرآوری شده با

انتروباکتر کلواسه، استافیلوکوکوس اسکویری و گونه بروی‌باکتریوم تفاوت معنی‌داری نداشت.



شکل ۱- تولید گاز آزمایشگاهی کاه گندم عمل‌آوری شده با باکتری‌های روده‌ی کرم خراط

Figure 1- *In vitro* cumulative gas production of wheat straw treated with *Zeuzera pyrina* L. gut bacteria during time of incubation



شکل ۲- تولید گاز آزمایشگاهی سرشاخه نیشکر عمل‌آوری شده با باکتری‌های روده‌ی کرم خراط

Figure 2- *In vitro* cumulative gas production of sugarcane tops treated with *Zeuzera pyrina* L. gut bacteria during time of incubation

همان‌طوری که در جدول ۴ نشان داده شده است، بیشترین غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه با انکوباسیون کاه گندم توسط مخلوط باکتری های روده‌ی کرم خراط به دست آمد (P<۰/۰۵)، هرچند آن تفاوتی با تیمار تلقیح شده با استافیلوکوکوس اسکویری نداشت. بیشترین غلظت استات و نسبت استات به پروپیونات با انکوباسیون کاه گندم توسط مخلوط باکتریایی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵)، هرچند آن اختلاف قابل توجهی با تیمار تلقیح شده با ایزوله استافیلوکوکوس اسکویری نداشت. همچنین، بیشترین میزان غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه با فرآوری کاه گندم توسط مخلوط باکتریایی حاصل شد که با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف قابل توجهی نشان داد (P<۰/۰۵). هرچند، غلظت سایر اسیدهای چرب فرار شامل پروپیونات، بوتیرات، ایزوبوتیرات، والرات و

ایزو والرات و pH شکمبه تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت.

جدول ٤– غلظت اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول در لیتر) و نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و pH کاه گندم عمل‌آوری شده با باکتری‌های روده‌ی کرم خراط[1]

Table 4- Concentration of volatile fatty acids (VFA; mmol/l) and ammonia-N (mg/dl) and pH of wheat straw (WS) treated with *Zeuzera pyrina* L. gut bacteria[1]

تیمارها Treatments	کل اسیدهای چرب فرار Total VFA	استات Acetate (A)	پروپیونات Propionate (P)	بوتیرات Butyrate	ایزوبوتیرات Iso-butyrate	والرات Valerate	ایزووالرات Iso-valerate	نسبت استات به پروپیونات A:P	pH	نیتروژن آمونیاکی NH3-N
کاه گندم (کنترل) WS (control)	31.9[b]	21.8[c]	7.17	3.20	0.31	0.35	0.59	3.05[b]	6.23	11.6[b]
کاه گندم+ انتروباکتر کلواسه WS + *E. cloacae*	33.1[b]	23.1[bc]	7.33	3.43	0.33	0.37	0.65	3.15[b]	6.17	12.1[b]
کاه گندم+ استافیلوکوکوس اسکویری WS + *S. sciuri*	33.7[ab]	24.7[ab]	7.33	3.83	0.35	0.42	0.64	3.39[ab]	6.18	12.5[b]
کاه گندم+ بروی‌باکتریوم WS + *Brevibacterium*	32.7[b]	24.3[abc]	7.47	3.63	0.35	0.36	0.62	3.34[ab]	6.16	12.3[b]
کاه گندم+ مخلوط باکتریایی WS + bacterial mixture	36.7[a]	26.8[a]	7.43	4.30	0.34	0.41	0.67	3.59[a]	6.08	13.5[a]
خطای استاندارد میانگین SEM	0.97	0.86	0.52	0.27	0.034	0.035	0.039	0.10	0.035	0.305
احتمال معنی‌داری P-value	0.04	0.02	0.75	0.11	0.56	0.64	0.59	0.04	0.11	0.02

۱میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند (P< 0.05).

[1]Means in a column with different superscripts differ significantly (P<0.05).

در مبحث فراسنجه‌های تخمیر سرشاخه نیشکر (جدول ۵)، بیشترین و کمترین میزان کل اسیدهای چرب فرار به ترتیب در تیمار تلقیح شده با مخلوط باکتریایی و تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵)، هرچند آن با تیمارهای فرآوری شده با انترو باکتر کلواسه و استافیلوکوکوس اسکویری تفاوتی نشان نداد. غلظت اسید چرب استات در تیمار فرآوری شده با مخلوط باکتریایی بیشترین میزان بود که با تیمار شاهد و سایر تیمارهای بیولوژیکی اختلاف قابل توجهی داشت (P<۰/۰۵). همچنین، بیشترین میزان نسبت استات به پروپیونات و نیتروژن آمونیاکی شکمبه در تیمار حاوی مخلوط باکتریایی و کمترین میزان آن‌ها در تیمار شاهد به دست آمد (P<۰/۰۵). هرچند سایر فراسنجه های تخمیر تحت تأثیر نوع ایزوله تلقیحی قرار نگرفت.

در ارتباط با فراوری بیولوژیکی پسماندهای لیگنو سلولزی توسط باکتری‌های جدا شده از روده حشرات مطالعات اندکی صورت گرفته است و عمده تحقیقات صورت گرفته در ارتباط با ایزوله‌های باکتریایی جدا شده از باکتریهای محیط در حال پوسیدگی بوده است. پژوهش حاضر اولین مطالعه‌ای است که در آن از باکتری‌های جدا شده از روده کرم خراط با قابلیت تجزیه‌کنندگی لیگنین و لیگنوسلولز، به‌عنوان عوامل بیولوژیکی جهت بهبود ارزش تغذیه‌ای مواد لیگنوسلولزی به عنوان خوراک دام استفاده شده است. باید اذعان نمود که در این مطالعه اثرات مطلوب فرآوری بیولوژیکی هر دو سوبسترای مورد آزمون یعنی کاه گندم و سر شاخه خرما با هر کدام از باکتری‌های جدا شده شامل انتروباکتر کلواسه، استافیلوکوکوس اسکویری و گونه بروی‌باکتریوم، و به خصوص تیمار حاوی مخلوط هر سه ایزوله در مقایسه با تیمار شاهد (فاقد هرگونه ماده تلقیحی) مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که در کرم خراط، علاوه بر آنزیم‌های درون‌زادی خود حشره، عمل تجزیه لیگنین و لیگنوسلولز توسط میکروفلور روده‌ای آن‌ها نیز انجام می‌شود. افزایش ناپدید شدن ماده خشک و کاهش میزان لیگنین در تیمارهای باکتریایی به خصوص تیمار حاوی مخلوط باکتریایی روده‌ی کرم خراط در مقایسه با تیمار شاهد نشان دهنده رشد باکتریایی و تجزیه‌ی لیگنین و لیگنوسلولز توسط ایزوله‌های مذکور است. مطابق با این نتایج، برجی (۱۳۸۲) گزارش کرد که فرآوری کاه گندم به مدت ۶ هفته توسط سه باکتری جدا شده از روده موریانه سبب ناپدید شدن ماده خشک بیشتری در مقایسه با تیمار شاهد شد (۸).

در مطالعه مذکور ناپدید شدن ماده خشک در ایزوله باسیوس اسفریکوس بیشتر از سایر ایزوله‌ها بود. باید بیان نمود که در مطالعه حاضر میزان ناپدید شدن ماده خشک در هر دو سوبسترا کمتر از مقادیر گزارش شده با فرآوری کاه گندم با باکتری‌های روده‌ی موریانه

بود (۷)، و از طرفی قابل مقایســه با نتایج مطالعه برجی و همکاران (۱۳۸۲) بود (۸) که دلیل آن احتمالاً به نوع سوبسترا و میکروارگانیسم استفاده شده مرتبط باشد.

جدول ۵- غلظت اسیدهای چرب فرار (میلی‌مول در لیتر) و نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) و pH سرشاخه نیشکر عمل‌آوری شده با باکتری‌های روده‌ی کرم خراط[۱]

Table 5- Concentration of volatile fatty acids (VFA; mmol/l) and ammonia-N (mg/dl) and pH of sugarcane tops (ST) treated with Zeuzera pyrina L. gut bacteria[1]

تیمارها Treatments	کل اسیدهای چرب فرار Total VFA	استات Acetate (A)	پروپیونات Propionate (P)	بوتیرات Butyrate	ایزوبوتیرات Iso-butyrate	والرات Valerate	ایزووالرات Iso-valerate	نسبت استات به پروپیونات A:P	pH	نیتروژن آمونیاکی NH_3-N
سرشاخه نیشکر (کنترل) ST (control)	29.9^{b}	20.6^{c}	6.63	2.87	0.28	0.30	0.52	3.11^{b}	6.28	12.4^{b}
سرشاخه+انتروباکتر کلواسه ST + *E. cloacae*	32.1^{ab}	22.1^{bc}	7.13	3.11	0.31	0.34	0.58	3.12^{b}	6.19	13.1^{ab}
سرشاخه+استافیلوکوکوس اسکویری ST + *S. sciuri*	32.7^{ab}	23.7^{b}	7.20	3.50	0.34	0.36	0.59	3.41^{ab}	6.22	13.4^{ab}
سرشاخه+بروی‌باکتریوم ST + *Brevibacterium*	31.7^{b}	23.3^{b}	7.37	3.51	0.32	0.33	0.56	3.26^{ab}	6.18	13.3^{ab}
سرشاخه+مخلوط باکتریایی ST + bacterial mixture	35.1^{a}	26.1^{a}	7.30	3.97	0.33	0.35	0.58	3.53^{a}	6.13	14.5^{a}
خطای استاندارد میانگین SEM	0.91	0.69	0.64	0.46	0.022	0.041	0.045	0.102	0.069	0.438
احتمال معنی‌داری P-value	0.03	<0.01	0.76	0.53	0.43	0.87	0.82	0.03	0.21	0.04

[۱] میانگین‌های هر ستون با حروف غیر مشابه دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($P< 0.05$)

[1] Means in a column with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

افزایش گوارش‌پذیری ماده خشک و به تبع انرژی قابل متابولیسم با تلقیح باکتریایی سوبستراها احتمالاً به دلیل تغییرات ایجاد شده در ترکیب شـــیمیایی آن‌ها یعنی کاهش میزان لیگنین و افزایش میزان پروتئین خام حین فرآوری بوده است. سست شدن ساختار لیگنوسلولز طی عمل‌آوری و به تبع آزاد شـدن میزان بیشـتر کربوهیدرات‌ها برای میکروارگانیســـم‌های شـــکمبه احتمالاً از دیگر دلایل افزایش هضـــم سوبستراهای لیگنوسلولزی بوده است (۲۵ و ۲۹).

افزایش تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسـیون (نمودار ۱ و۲) با فرآوری بیولوژیکی هر دوی کاه گندم و سـرشـاخه نیشـکر توسـط ایزوله‌های جدا شــده از روده‌ی کرم خراط در وهله اول نشــان دهنده رشد مناسب این ایزوله‌ها روی سوبستراها در محیط کشت مایع بوده است و احتمالاً سبب کاهش میزان لیگنین آن‌ها (جدول ۳) و یا سست کردن پیوندهای بین لیگنین با سـلولز و همی‌سـلولز بوده اسـت که به میزان بیشتری توسط مخلوط میکروبی شکمبه تجزیه و تخمیر شده‌اند (۷). زیرا رابطـه معکوس بین محتوای لیگنین مواد خوراکی بـا گوارش‌پذیری آن‌ها در دســتگاه گوارش نشــخوارکنندگان ثابت شــده است (۳۴). برای بهبود دسترسی آنزیم‌های هیدرولیتیک میکروبی به سـلولز و همی‌سـلولز برای افزایش ارزش غذایی مواد لیگنوسـلولزی، تجزیه پیوندهای بین لیگنین و کربوهیدرات‌های آن ضـــروری اســـت (۳۱). افزایش غلظت استات و نسبت استات به پروپیونات در تیمارهای فرآوری شـده احتمالاً به دلیل دسـترسـی بیشـتر به کربوهیدرات‌های ساختمانی توسط میکروب‌های شکمبه بوده است، زیرا به خوبی نشان داده شـده اسـت که تخمیر سـوبسـتراهای فیبری در شـکمبه سـبب افزایش تولید ترکیبات لیپوژنیک مانند اســتات می‌شــود (۱۹). این افزایش غلظت استات در سوبستراهای فراوری شده مطابق با نتایج تولید گاز آزمایشگاهی است، زیرا مشخص شده است که گاز زمانی تولید می شود که سوبسترای انکوبه شده به استات و بوتیرات تخمیر شود (۱۳). افزایش محتوای پروتئینی سوبستراهای فراوری شده توسط باکتری‌های روده‌ی کرم خراط در مقایســه با تیمار شــاهد (جدول ۳) احتمالاً دیگر دلیل بهبود هضم و تخمیر و تولید بیشتر اسیدهای چرب فرار آن‌ها در شکمبه بوده است. زیرا احتمالاً مخلوط توده باکتریایی و آنزیم‌های داخل و خارج سلولی مترشحه توسط باکتری‌های کرم خراط روی سوبستراها باقی مانده و به‌عنوان منبع پروتئین برای میکروب‌های شکمبه استفاده شده‌اند (۷). نتایج پژوهش برجی و همکاران (۱۳۸۲) که فرآوری کاه گندم با باکتری‌های روده موریانه سـبب افزایش ۴۲ درصدی پروتئین خام سوبسترا در مقایسه با تیمار شاهد شد (۸)، تایید

کننده نتایج مطالعه حاضر است. افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه (جداول ۴ و ۵) با انکوباسیون سوبستراهای فرآوری شده تأیید کننده نتایج حاضر است. در مطالعه حاضر فرآوری بیولوژیکی هر دو سوبسترای مورد آزمون توسط تیمار حاوی مخلوط هر سه باکتری کرم خراط اثرات مطلوب‌تری در مقایسه با ایزوله‌های مجزا نشان داد. علت آن احتمالاً به خاطر تجزیه بهتر لیگنین و لیگنوسلولز توسط تنوع بیشتری از آنزیم‌های مترشحه از این باکتری‌ها بوده است. در هر اکو سیستم میکروبی، معمولاً تجزیه سوبسترا توسط مجموعه‌ای از آنزیم‌ها و یک کمپلکس آنزیمی صورت می‌گیرد که این نکته در مورد مطالعه حاضر نیز صادق است.

در تطابق با نتایج پژوهش حاضر، برجی و همکاران (۱۳۸۲) با فرآوری کاه گندم و کاه جو با باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش موریانه های آناکانتوترمس واگانژ (انتروباکتر کلواسه، آکروباکتریوم آنتروپی و باسیلوس اسفریکوس) در محیط کشت مایع به مدت ۳، ۶ و ۹ هفته، گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی آن را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داد (۸). همچنین، در مطالعه دیگری، سه باکتری با قابلیت تجزیه کنندگی لیگنین و لیگنوسلولز شامل باسیلوس لیچنیفورمیس، آکروباکتریوم اینترمدیوم و میکروباکتریوم پالادیکولا از روده موریانه‌های میکروسروترمس دایورسوس جدا شد (۷). پس از فرآوری کاه گندم و سرشاخه خرما با ایزوله‌های مذکور به مدت ۶ هفته، تأثیر اندکی روی ترکیب شیمیایی آن ها نشان داد، اما گوارش‌پذیری مواد مغذی در شرایط برون‌تنی افزایش یافت. در مطالعه دیگری توسط عزیزی و همکاران (۱۳۹۶)، انکوباسیون برون‌تنی کاه گندم و سرشاخه خرمای فرآوری شده با ایزوله‌های باکتریایی جدا شده از روده موریانه به مدت ۶ هفته، سبب افزایش تولید گاز آزمایشگاهی و ناپدید شدن شکمبه‌ای مواد مغذی در گاو هلشتاین در شرایط برون‌تنی در مقایسه با تیمار شاهد شد، و ایزوله باسیلوس لیچنیفورمیس نسبت به دیگر ایزوله‌ها ارزش غذایی سوبستراها را به میزان بیشتری افزایش داد (۶). در پژوهش دیگری نیز با فرآوری کاه گندم با قارچ صدفی پلوروتوس فلوریدا نشان داد که ارزش غذایی و قابلیت هضم مواد مغذی آن در مقایسه با تیمار شاهد به طوری معنی‌داری افزایش نشان داد (۱۲). افزایش ۱۱ درصدی گوارش‌پذیری ماده خشک کاه گندم توسط فرآوری با گونه قارچی پلوروتوس اوستراتوس نیز گزارش شده است (۳۸). هرچند، بر خلاف نتایج مطالعه حاضر، در آزمایشاتی عمل‌آوری بیولوژیکی مواد لیگنو سلولزی تأثیری بر ارزش تغذیه‌ای آن‌ها نداشته است. به عنوان مثال، در پژوهشی فرآوری سوبسترا با قارچ‌های پوسانننده تأثیری بر قابلیت هضم مواد مغذی آن نداشته است (۱۰). همچنین، در مورد دیگری فرآوری با قارچ اثر بازدارندگی بر قابلیت هضم مواد مغذی نشان داده است (۲۲). اخیراً در پژوهشی کاهش مدت زمان فرآوری کاه گندم و سرشاخه خرما توسط باکتری‌های جدا شده از روده موریانه به ۳ هفته، تأثیری بر تولید گاز، غلظت اسیدهای چرب فرار، قابلیت هضم آزمایشگاهی ماده خشک و الیاف نامحلول در شوینده خنثی کاه گندم در مقایسه با تیمار شاهد نداشته، اما صفات مذکور در سرشاخه خرما کاهش یافت (۵). این اختلافات مشاهده شده در مطالعات مختلف در بحث فرآوری بیولوژیکی مواد لیگنوسلولزی احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع عامل بیولوژیکی و قابلیت تجزیه‌کنندگی آن‌ها، نوع سوبسترای مورد استفاده، نوع محیط کشت مورد استفاده (جامد یا مایع) و مدت زمان فرآوری سوبسترا باشد که منجر به حصول نتایج مختلفی شده است.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر سه ایزوله باکتریایی با قابلیت تجزیه‌کنندگی لیگنین و لیگنوسلولز شامل انتروباکتر کلواسه، استافیلوکوکوس اسکویری و گونه بروی‌باکتریوم بر اساس تعیین توالی 16S rDNA از روده‌ی کرم خراط جدا سازی و شناسایی شدند. فرآوری کاه گندم و سرشاخه نیشکر به عنوان دو سوبسترای لیگنوسلولزی توسط باکتری‌های مذکور، سبب افزایش ناپدید شدن ماده خشک، افزایش محتوای پروتئین خام و کاهش میزان لیگنین خام شده و به تبع، گوارش‌پذیری ماده خشک و ارزش غذایی آن‌ها در شرایط برون‌تنی افزایش یافت. همچنین، تیمار حاوی مخلوط هر سه ایزوله باکتریایی بهترین عملکرد را بر صفات مذکور نشان داد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان، در جهت فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام پژوهش حاضر تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

1. Abd El-Rahman, H., A. A. Abedo, Y. A. A. El-Nomeary, S. S. Abdel-Magid, and M. I. Mohamed. 2014. Effect of biological treatments of rice straw on growth performance, digestion and economical efficiency for growing calves. Global Veterinary, 13(1):47–54.
2. AOAC. 2002. Official Methods of Analysis of AOAC International (17th Ed., 1th rev.). Gaithersburg (MD): Association of Official Analytical Chemists.
3. Ashtari, M., J. Karimi, M. Z. Rezapanah, and M. Hassani-kakhki. 2011. Biocontrol of leopard moth, *Zeuzera pyrina*

L. (Lep.: Cossidae) using entomopathogenic nematodes in Iran. Insect Pathogens and Entomopathogenic Nematodes, 66: 333-335.
4. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingstone, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1992. Short protocols in molecular biology, Second edition. JohnWiley and Sons, New York, pp. 1–15.
5. Azizi, A., M. R. G. Maia, A. J. M. Fonseca, A. Sharifi, H. Fazaeli, and A. R. J. Cabrita. 2018. Rumen fermentation of lignocellulosic biomass from wheat straw and date leaf inoculated with bacteria isolated from termite gut. Journal of Animal and Feed Sciences, 27: 211-218.
6. Azizi, A., T. Mohammadabadi, H. Motamadi, M. Chaji, and H. Fazaeli. 2017. Determination of optimum temperature and pH for lignocellulosic materials-degrading bacteria isolated from termite gut and their effect on the digestibility and in *vitro* fermentation parameters of some agricultural by-products. Journal of Animal Science Research, 27: 69-85 (In Persian).
7. Azizi-Shotorkhoft, A., T. Mohammadabadi, H. Motamedi, M. Chaji, and H. Fazaeli. 2016. Isolation and identification of termite gut symbiotic bacteria with lignocellulose-degrading potential, and their effects on the nutritive value for ruminants of some by-products. Animal Feed Science and Technology, 221: 234-242.
8. Borji, M. 2003. The Survey Possibility of Straw Polysaccharides and Lignin Degradation by Isolated Microbiota from Termites PhD Thesis. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (In Persian).
9. Broderick, G. and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. Journal of Dairy Science, 63: 64–75.
10. Calzada, J., F. Franco, M. C. Arriola, C. Rolz, and M. A. Ortiz. 1987. Acceptability, body weight changes and digestibility of spent wheat straw after harvesting of *Pleuprotus sajor-caju* fed to lambs. Biological Wastes, 22: 303-309.
11. Cottyn, B. G. and C. V. Boucque. 1968. Rapid method for the gas-chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 16: 105–107.
12. Fazaeli, H. 2008. Digestibility and voluntary intake of fungal-treated wheat straw in sheep and cow. Agricultural Science, 12 (43): 523-531.
13. Getachew, G., M. Blummel, H. P. S. Makkar, and K. Becker. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Animal Feed Science and Technology, 1998: 72: 261–281.
14. Ghasemi, E., G. R. Ghorbani, M. Khorvash, and K. Karimi. 2014. Adjustment of pH and enzymatic treatment of barley straw by dry processing method. Journal of Applied Animal Research, 42:1-6.
15. Ghasemi, E., M. Khorvash, G. R. Ghorbani, M. R. Emami, and K. Karimi. 2013. Dry chemical processing and ensiling of rice straw to improve its quality for use as ruminant feed. Tropical Animal Health and Production, 45: 1215–1221.
16. Kato, K., S. Kozaki, and M. Sakuranaga. 1998. Degradation of lignin compounds by bacteria from termite guts. Biotechnology Letters, 20: 459-462.
17. Kerr, T. J. and R. D. Kerr. 1987. Microorganisms having characteristics of an *Arthrobacter* capable of degrading peanut hull lignin. United State Patent, 4, 643,899.
18. Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace, 1985. Rapid determination of 16s ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82: 6955-6959
19. Loor, J. J., A. A. Elolimy, and J. C. McCann. 2016. Dietary impacts on rumen microbiota in beef and dairy production Animal Frontiers, 6: 22–29.
20. Marten, G. C. and R. F. Barnes. 1980. Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzymes systems. In: Pidgen, W. J., C. C. Balch, and M. Graham (Eds), Standardization of analytical methodology for feeds. International Development Research Center, Ottawa, pp. 61-71.
21. Menke, K. H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28: 7–55.
22. Moyson, E. and H. Verachtert. 1991. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, 36: 421-424.
23. Nasehi, M, N. M. Torbatinejad, S. Zerehdaran, A. R. Safaei. 2014. Effect of (*Pleurotus florida*) fungi on chemical composition and rumen degradability of wheat and barley straw. Iranian Journal of Applied Animal Science, 4(2): 257-261
24. NRC. 2001. Nutrient Requirements for Dairy Cattle (7th rev. Ed.). USA: National Academy Press. Washington, DC.
25. Okano, K., N. Ohkoshi, A. Nishiyama, T. Usagawa, and M. Kitagawa. 2009. Improving the nutritive value of madake bamboo, *Phyllostachys bambusoides*, for ruminants by culturing with the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. Animal Feed Science and Technology, 152: 278–285.
26. Ørskov, E. R. and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. Journal of Agricultural Science, 92: 499–503.
27. Pashaei, S., V. Razmazar, and R. Mirshekar. 2010. Gas production: a proposed *in vitro* method to estimate the extent of digestion of a feedstuff in the tumen. Journal of Biological Sciences, 10: 573-580.
28. Robertson, J. B. and P. J. Van Soest, 1981. The detergent system of analysis and its application to human foods. In:

James W. P. T., O. Theander (Eds.), The Analysis of Dietary Fiber in Food. (pp. 123-158). Marcel Dekker, New York, USA.

29. Salman, F. M., R. I. El-Kadi, H. Abdel-Rahman, S, M. Ahmed, M. I. Mohamed, and M. M. Shoukry. 2008. Biologically treated sugar beet pulp as a supplement ingoat rations. International Journal of Agricultural Biology, 10: 412–416.
30. SAS Institute Inc. 2005. User's Guide: Statistics, Version 9.0 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
31. Shrivastava, B., P. Nandal, A. Sharma, K. K. Jain, Y. P. Khasa, T. P. Das, V. Mani, N. J. Kewalramani, S. S. Kundu, and R. C. Kuhad. 2012. Solid state bioconversionof wheat straw into digestible and nutritive ruminant feed by *Ganoderma* sp rckk02. Bioresource Technology, 107: 347–351.
32. Theodorou, M. K., B. A.Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48: 185–197.
33. Ulyshen, M. D. 2016. Wood decomposition as influenced by invertebrates. Biological Reviews, 91: 70-85.
34. VanSoest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant, 2nd ed. Cornell Univ. Press, Itacha, NY, USA, pp. 476.
35. Vercoe, P. E., H. P. S. Makkar, and A. C. Schlink. 2010. *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. Springer Verlag Gmbh.
36. Voirol, L. R. P., E. Frago, M. Kaltenpoth, M. Hilker, and N. E. Fatouros. 2018. Bacterial symbionts in lepidoptera: their diversity, transmission, and impact on the host. Fronteries in Microbiolgy, 27: 549-:556.
37. Weisburg, W. G., S. M. Borns, D. A. Pelltier, and D. J. Lane. 1991. 16s Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of* Bacteriology, 173(6): 697-703.
38. Yoshida, N., T. Takahashi, T. Nagao, and J. Chen. 1993. Effect of edible mushroom (*Pleurotus ostreatus*) cultivation on *in vitro* digestibility of wheat straw and sawdust substrate. Japanese Journal of Grassland Science, 39: 177-182.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 13, No. 2, Summer 2021, p. 207-220

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۱۳، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، ص. ۲۲۰-۲۰۷

Investigating nutritive value of wheat straw and sugarcane tops treated with bacteria with lignin and lignocellulose-degrading potential isolated from *Zeuzera pyrina* L. larvae gut

Ayoub Azizi[1*], Jahanshir Shakarami[2], Fahimeh Dehghanikhah[3], Afrooz Sharifi[4]

Submitted: 02-10-2020
Accepted: 15-09-2020

Introduction[1]: There is a shortage of animal feed and water resources in many countries around the world. Numerous agricultural by-products are produced annually in all countries, thus their proper use is often a useful means of overcoming this problem. Large proportions of these materials are important feeds for ruminant animals and can be used as a potentially significant source of energy. However, the use of these materials as ruminant feed is limited because of their complex structure, low protein and high lignin content. Different physical and chemical methods have been used to increase the nutritive value of such by-products. Although these methods have advantages, they are costly, relatively ineffective and environmentally unfriendly and require the application of technology. Recently, biological processing of lignocellulosic biomass has been considered as an alternative approach. Three groups of organisms are able to biodegrade lignin namely, white rot fungi, some soil microbes and termites. In recent years, increased attention has been given to the role of bacteria in lignin degradation in agricultural by-products. Insects that utilize wood as a food source are beetles, cockroaches and termites. Termites are especially well known for their ability to break down the lignin barrier and digest carbohydrate polymers. Researcher has isolated 3 bacterial species from the *Anacanthotermes vagans* termite gut, including *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., and *Ochrobacterium* sp. These bacteria could grow on different media containing lignin and lignocellulosic materials prepared from water extracted wheat straw and sawdust as a sole source of carbon and energy. In another study three bacteria include *Bacillus licheniformis*, *Ochrobactrum intermedium* and *Microbacterium paludicola* were isolated by culturing the gut contents of the termite *Microcerotermes diversus* on different media containing lignin and lignocellulose as a sole source of carbon and energy. Isolates could partially change the chemical composition of the wheat straw and date leaves, while nutrient digestibility increased. However, *Zeuzera pyrina* L. is also another insect which degrade lignocellulose. Larval tunnels in the wood and girdling burrows under the bark are visible at the ends of broken stems. Numerous partly broken branches with dead brown foliage hanging in tree crowns are characteristic of heavy infestations. In our knowledge, little work has been done on the isolation of lignin and lignocellulose-degrading bacteria from gut of *Zeuzera pyrina*. Therefore, the aim of the present study was to isolate and identify symbiotic lignocellulosic degrading bacteria from the *Zeuzera pyrina* L. gut, and to investigate their effects on the nutritive value of wheat straw and sugarcane tops as ruminant feed.

Material and Methods: This experiment was conducted in animal house and laboratories of Lorestan University. Two Lori cows (about five years old) with permanent rumen fistula were used as rumen liquor donor in present study. A two-week diet adaptation period was followed by collection of the rumen contents from each cow before the morning feeding. The aim of the present study was investigate nutritive value of wheat straw (WS) and sugarcane tops (ST) treated with bacteria isolated from gut of *Zeuzera pyrina*. For this purpose, first, based on 16S rDNA sequence analysis, 3 bacteria including *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus sciuri* and *Brevibacterium* sp., with lignin and lignocellulose-degrading potential were isolated from gut of this insect. Thereafter, each of WS or ST were processed with these isolated individually or with mix of them (totally 4 treatment group for each substrate) in liquid medium. Chemical composition, *in vitro* gas production (IVGP) and

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University
2- Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University
3- Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University
4- Assistant Professor, Animal Science Research Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Ahvaz
(*- Corresponding Author Email: azizi.ay@lu.ac.ir)
DOI:10.22067/ijasr.v13i2.83479

fermentation parameters of these two processed by-product were determined compared to control treatment.

Results and Discussion: Results showed that highest amount of dry matter (DM) loss, crude protein, *in vitro* DM digestibility and metabolizable energy was observed in both substrates (i.e., WS and ST) treated with bacterial mixture of *Zeuzera pyrina* compared to control. Highest volume of IVGP and potential of GP (b) were observed after processing by bacterial mixture of *Zeuzera pyrina* compared to control treatment (P>0.05). Highest volatile fatty acid (VFA) concentration, acetate, acetate to propionate ratio and ammonia-N concentration were observed in substrates inoculated with bacterial mixture in comparison with control treatment (P<0.05).

Conclusion: In this experiment, we isolated three bacteria including *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus sciuri* and *Brevibacterium* sp., with lignin and lignocellulose-degrading potential from the gut of *Zeuzera pyrina*. Processing WS and ST with these individual bacteria, especially media containing their mixture improved their nutritive value as ruminant feed via increasing DM digestibility and VFA production.

Keywords: Gas production, Lignocellulose, Nutritive value, Ruminants, *Zeuzera pyrina*